



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **71632** (13) **U**
(51) МПК
G01N 21/64 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | |
|--|---|
| (21) Номер заявки: u 2011 14390 | (72) Винахідник(и): Погромська Яна Анатоліївна (UA), Зуза Віктор Олексійович (UA), Смірнова Катерина Борисівна (UA), Горякіна Вікторія Миколаївна (UA) |
| (22) Дата подання заявки: 05.12.2011 | |
| (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.07.2012 | |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.07.2012, Бюл.№ 14 | (73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ ҐРУНТОЗНАВСТВА ТА АГРОХІМІЇ ІМЕНІ О.Н. СОКОЛОВСЬКОГО", вул. Чайковського, 4, м. Харків, 61024 (UA) |

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ПІГМЕНТІВ ХЛОРОФІЛУ ТА КАРОТИНОЇДІВ

(57) Реферат:

Спосіб визначення вмісту пігментів хлорофілу та каротиноїдів включає фотографування цифровою фотокамерою листя рослин на фоні білого аркуша паперу, за допомогою використання комп'ютерних програм визначають інтенсивність червоного і синього кольору зображення у пікселях, та показники поглинання зеленим листям в цих областях спектра. Визначають параметр кольоровості, як результат ділення показників поглинання червоного і синього кольору, та встановлюють кількісну характеристику хлорофілу а і b та каротиноїдів у мг/100 г вологої речовини .

UA 71632 U

Корисна модель належить до біологічної області й може бути використаний в дослідженнях з фізіології рослин, біофізики та біохімії, у сільськогосподарській практиці та інших сферах науково-практичної діяльності, що потребують кількісного визначення пігментів хлорофілу а і b та каротиноїдів у рослинах для прогнозування валових зборів врожаю та визначення збалансованого живлення рослин.

Інтенсивність зеленого кольору листа рослини може служити показником його стану та здатності до урожайності. Тому, можливість найбільш точного визначення кількості вмісту пігментів хлорофілу в рослині є актуальною проблемою. Навіть фахівець не може покладатися на своє треноване око для оцінки ступеня зеленого кольору листа. Об'єктивної оцінки перешкоджають нерівномірне освітлення, наявність плям на поверхні, дефіцит азоту та мікроелементів. Крім того "насичений зелений" ще не означає "багато хлорофілу" - ця помилкова думка часто зустрічається.

Відомо спосіб, який широко використовується у дослідницькій практиці, який базується на екстрагуванні пігментів із листа полярними розчинниками (етанолом, ацетоном) або сумішшю полярних та не полярних розчинників (петролейний ефір, гексан, бензин, бензол). Концентрацію пігментів визначають спектрофотометричне [Практикум по физиологии растений / Н.Н. Третьяков, Т.В. Карнаухова, Л.А. Паничкин и др.-3-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1990.-271 с.].

Такий спосіб характеризується достатньою точністю та чутливістю.

Недоліком є те, що він потребує спеціальне технічне оснащення для спектрального аналізу, хімічну апаратуру, посуд, реактиви та достатньо багато часу для проведення аналізу, що ускладнює одночасне аналізування великої партії зразків.

Відомо спосіб визначення вмісту хлорофілу в листках рослин [RU 92010565 Способ определения содержания хлорофилла в листьях растений] на основі детектування флуоресценції хлорофілу. За допомогою розподілу флуоресцентного випромінювання хлорофілів на два промені з довжинами хвиль 685 й 735 нм за допомогою спектрально-селективного інтерференційного фільтра, одночасного проводять вимір інтенсивності випромінювання на цих довжинах хвиль двома ідентичними фотоприймачами та визначення їх відносин за допомогою підсилювача.

Спосіб носить інноваційний характер, легкий у виконанні та дозволяє аналізувати рослини на вміст хлорофілу in vivo.

Недоліком є те, що спосіб потребує спеціальну апаратуру для підсилення та детектування сигналу випромінювання хлорофілу. Крім того не має відомостей щодо визначення вмісту різновидів хлорофілу, а саме, хлорофілів а і b. Та також спосіб не можливо застосовувати до визначення вмісту каротиноїдів з причини відсутності у каротиноїдів флуоресценції.

Найбільш близьким за кількістю схожих ознак та технічному результату до запропонованого [Digital Photo Chrom Analyse und DPCA-kalibrierte Fluoreszenzanalyse in der Praxis. Internationales Forschungs-und Entwicklungsprojekt. Radostim, 2009] є спосіб DPCA, який на основі аналізу цифрової фотографії листа рослини дозволяє визначити коефіцієнт хлорофілу C^* . Кольорові фотографії листа рослин на фоні контрольного білого аркуша паперу аналізують за допомогою використання цифрових редакторів зображення, які мають функцію визначення середніх RGB, а саме - інтенсивності червоного та синього кольорів у пікселях (CorelDraw, Photoshop, тощо). Отримують значення відносного поглинання у синьої та червоної області спектра зеленим листом рослини. Коефіцієнт хлорофілу C^* розраховується як середнє арифметичне поглинання синього та червоного світла за формулою:

$$C^* = (K_r A_r + K_b A_b) / (K_r + K_b),$$

де A_r та A_b - відносне поглинання світла у червоній та синій області спектра,

K_r та K_b - коефіцієнти калібровки камери та еталону, кількісні значення яких наближаються до одиниці.

Спосіб відображає концентрацію хлоропластів у рослинній клітині та сумарний потенціал фотосинтезу, крім того, він може бути використаний для прогнозування валових зборів врожаю.

Спосіб легкий у використанні, не потребує спеціальної апаратури.

Недоліком є те, що коефіцієнт C^* визначають у відносних одиницях, що не дозволяє використовувати цей показник для порівняння з даними концентраційних визначень хлорофілу за іншими способами. Крім того спосіб не дає інформацію щодо кількісного вмісту різновидів хлорофілу та сумарних каротиноїдів.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу за рахунок визначення різновидів хлорофілу та каротиноїдів в рослинах та підвищення об'єктивності отриманих результатів про стан рослин, при експресності та зниженні собівартості.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі визначення пігментів хлорофілу та каротиноїдів, який включає фотографування цифровою фотокамерою листя рослин на фоні білого аркушу паперу, за допомогою використання комп'ютерних програм визначають інтенсивність червоного і синього кольору зображення у пікселях та показники поглинання зеленим листям в цих областях спектру, згідно з корисною моделлю, визначають параметр кольоровості, як результат ділення показників поглинання червоного і синього кольору та встановлюють кількісну характеристику хлорофілу а і b та каротиноїдів у мг/100 г вологої речовини за формулами:

$$X_{\text{ла}} = 10,82e^{3,5407\left(\frac{A_r}{A_b}\right)^2}, \quad (1)$$

$$X_{\text{лб}} = 66,7e^{392,93\frac{A_r}{A_b^2}}, \quad (2)$$

$$K_{\text{ар}} = 446,52\left(\frac{A_r}{A_b}\right)^3 - 588,88\left(\frac{A_r}{A_b}\right)^2 + 231,17\frac{A_r}{A_b} - 9,79, \quad (3)$$

де A_r , A_b - абсорбція у червоній та синій області спектра, відносні одиниці;

$X_{\text{ла}}$ - вміст хлорофілу а, мг/100 г;

$X_{\text{лб}}$ - вміст хлорофілу b, мг/100 г;

$K_{\text{ар}}$ - вміст сумарних каротиноїдів, та за їх показниками судять про стан рослини, за яким прогнозують врожайність.

Застосування способу у фундаментальних біофізичних дослідженнях та у дослідницькій та виробничій діяльності дає можливість визначати валову продукцію екосистем, збалансованість живлення рослин й прогнозувати та регулювати врожайність сільськогосподарських культур.

Для вирішення поставленої задачі було проведено велику кількість дослідів, на основі яких було встановлено математичний зв'язок між показниками кольоровості зображення зеленого листя та вмістом пігментів. Тобто, було знайдено залежність кількісних показників вмісту хлорофілів а і b та каротиноїдів від інтенсивностей поглинання листям червоного та синього світла. Отримані дані, при підстановці у які значень червоного та синього поглинання, дозволяють визначити величини вмісту хлорофілів а і b та сумарних каротиноїдів у кількісних одиницях, наприклад, у мг/100 г сирої зеленої маси листя.

Об'єктом калібрування послужив в'юнок (*Ipomoea purpurea*). Листя якого сфотографовано на фоні білого аркуша паперу при чистому небі поза приміщенням на відстані до об'єкта від 30 см до 40 см цифровим фотоапаратом Olympus SP-600UZ (CCD - кількість пікселів 12,5 млн.) у режимі макро при фіксованих часі експозиції, чутливості та відповідному балансі білого.

Перегляд гістограм каналів у кольорі та визначення середнього значення червоної R та синьої B світності у пікселях для найбільш представницьких ділянок зображення листя та для контрольних зображень білого аркуша паперу (R_e та B_e) проведено за допомогою програмного пакета CorelDraw 13 (креслення).

На кресленні показано визначення за допомогою пакета CorelDraw 13 значень R та B - середніх інтенсивностей червоного та синього кольору зображення зеленого листя та ділянки білого аркуша паперу, виражених у пікселях.

Поглинання листям червоного та синього світла розраховано як зменшення світності у відсотках відносно відповідної світності білого аркуша:

$$A_r = 100(R_e - R)/R_e \quad (4)$$

$$A_b = 100(B_e - B)/B_e, \quad (5)$$

де A_r і A_b - поглинання (абсорбція) листям червоного та синього світла у відсотках,

R і B та R_e і B_e - середні значення інтенсивності червоного і синього кольору зображення листя та білого аркуша у пікселях.

Одержані дані щодо вмісту хлорофілу а і b та каротиноїдів було підтверджено методом біохімічного аналізу сфотографованого листя [Метод биохимического анализа растений / Под ред. В.В. Полевого, Г.Б. Максимова. - Л.: Изд-во ЛГУ, 1978.-192 с.].

За результатами аналізу цифрового фото зеленого листя було встановлено, що вміст різних пігментів фотосинтезу у листі (виражений у мг/100 г вологої речовини) більш тісно корелює не з коефіцієнтом хлорофілу C^* (згідно з прототипом), а з встановленими нами відповідними співвідношеннями показників поглинання у червоній та синій області спектра, що обумовлені спектральними характеристиками хлорофілів та каротиноїдів.

Опрацювання способу проводилося у польових дослідженнях вирощування кукурудзи на ґрунтах з різним вмістом азоту та фосфору, що наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

| Варіант | P_2O_5 , мг/100 г ґрунту | NO_3 , мг/100 г ґрунту |
|---------|----------------------------|--------------------------|
| 1 | 18,76 | 2,61 |
| 2 | 15,91 | 1,58 |
| 3 | 17,01 | 6,07 |
| 4 | 23,91 | 10,55 |
| 5 | 22,62 | 4,61 |
| 6 | 29,79 | 0,73 |
| 7 | 16,00 | 0,24 |

В таблиці 2 наведено біометричні показники зеленої маси кукурудзи у період початку цвітіння.

Спосіб працює наступним чином:

1. Листя кукурудзи, що досліджується на предмет вмісту хлорофілу (а і b) та сумарних каротиноїдів, було сфотографовано на фоні білого аркуша паперу цифровою фотокамерою у режимі макро на відстані 30-40 см при фіксованих часі експозиції, чутливості та відповідному балансі білого.

Таблиця 2

| № | Варіант | Вага однієї рослини, г | Висота рослини, см |
|------------|--|------------------------|--------------------|
| 1 | Контроль - добрива, кореневе та некореневе підживлення не застосовували. | 11,50 | 64,32 |
| 2 | N_{60} | 30,23 | 88,57 |
| 3 | N_{90} | 30,76 | 86,54 |
| 4 | $N_{90}P_{60}$ | 28,39 | 84,51 |
| 5 | $N_{90}P_{60}K_{40}$ | 41,90 | 82,89 |
| 6 | $P_{60}K_{40}$ | 25,87 | 74,44 |
| 7 | K_{40} | 11,32 | 55,84 |
| $HP_{0,5}$ | | 5,46 | 6,31 |

2. Цифрові зображення переносяться на ПК та відкриваються у цифровому редакторі. На кожному фото вибирається ділянка зображення листя і ділянка контрольного зображення білого аркуша та визначається за допомогою функції "гістограма" R і B та R_e і B_e - середні значення інтенсивності червоного і синього кольору зображення листя та білого аркуша у пікселях.

3. По формулах (4) та (5) одержується відносно поглинання листям червоного та синього світла.

4. Для визначення вмісту кожного виду пігментів розраховується відповідний показник кольоровості: $\left(\frac{A_r}{A_b}\right)^2$ для хлорофілу а, $\frac{A_r}{A_b^2}$ для хлорофілу b, та $\frac{A_r}{A_b}$ для сумарних каротиноїдів.

5. Підставляючи значення показників кольоровості у відповідні регресійні рівняння (1), (2), (3) отримують кількісні значення вмісту хлорофілів а і b та сумарних каротиноїдів у мг/100 г сирової зеленої маси листя.

Одержані дані в залежності від варіанта обробки кукурудзи у фазі 6-7 листів зводяться в таблицю 3 для експресного отримання відомостей про стан рослин та прогнозування урожайності.

Таблиця 3

| Варіант | $(A_r/A_b)^2$ | $A_r/A_b^2 \cdot 10^{-4}$, відносні одиниці | A_r/A_b | Хла, мг/100 г | Хлб, мг/100 г | Кар, мг/100 г |
|---------|---------------|--|-----------|---------------|---------------|---------------|
| 1 | 0,32 | 69 | 0,56 | 33,81 | 9,86 | 16,93 |
| 2 | 0,44 | 85 | 0,66 | 51,94 | 18,87 | 20,32 |
| 3 | 0,46 | 87 | 0,68 | 55,57 | 20,17 | 21,60 |
| 4 | 0,47 | 88 | 0,68 | 57,26 | 21,41 | 21,94 |
| 5 | 0,52 | 87 | 0,71 | 67,43 | 20,71 | 24,72 |
| 6 | 0,23 | 59 | 0,48 | 24,68 | 6,72 | 17,11 |
| 7 | 0,21 | 55 | 0,45 | 22,48 | 5,71 | 17,48 |

Примітка. A_r і A_b - поглинання у червоній та синій області спектру

Встановлено, що при надлишку фосфору в ґрунті внесення основного азотного добрива (варіанти 2-5) підвищує вміст зелених пігментів у листі кукурудзи на 54-117 відсотків. А всі варіанти без додаткового внесення азоту (варіанти 6-7) негативно впливають на вмісті

5

хлорофілів, що призводить до зменшення їх кількості від 27 % до 48 %. Вміст каротиноїдів збільшується як при збалансуванні живлення по азоту, так і у варіантах на фоні азотного голодування, але у різному ступеню (від 20 % до 46 % та від 1 % до 5 % відповідно), за рахунок загальної інтенсифікації синтетичних процесів у першому випадку, та стресового стану у другому.

10

Тобто спосіб дозволяє прослідкувати динаміку показників стану системи фотосинтезу при оптимізації мінерального живлення та за стресових умов.

Кореляційний аналіз показників урожайності кукурудзи дав позитивний зв'язок між вмістом пігментів, що приймають участь у фотосинтезі, та висотою і вагою рослин з коефіцієнтом кореляції 0,88-0,90. Також показано негативний зв'язок між співвідношенням вмісту хлорофілів а і b та показниками урожайності кукурудзи з коефіцієнтом кореляції -0,91 для висоти рослини та -0,75 для ваги зеленої маси. Тобто, за одержаними значеннями можна прогнозувати значний за величиною майбутній врожай в 5 варіанті.

15

Запропонований спосіб може застосовуватися як у прикладних, так і у фундаментальних дослідженнях. Переваги способу, що запропоновано:

20

1. Спосіб дозволяє кількісно оцінити in vivo вміст хлорофілів а і b та сумарних каротиноїдів за допомогою аналізу кольорового фото.

2. Простий у виконанні.

3. Не потребує спеціальної апаратури.

4. Дозволяє економити на хімічному устаткуванні та реактивах.

25

5. Потребує мінімум часу для проведення аналізу.

6. Дозволяє проводити серійні аналізи великої ємкості у стислі строки.

7. Спосіб придатний до застосування у прогнозуванні урожаю сільськогосподарських культур.

30

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення вмісту пігментів хлорофілу та каротиноїдів, який включає фотографування цифровою фотокамерою листя рослин на фоні білого аркуша паперу, за допомогою використання комп'ютерних програм визначають інтенсивність червоного і синього кольору зображення у пікселях, та показники поглинання зеленим листям в цих областях спектра, який

35

відрізняється тим, що визначають параметр кольоровості, як результат ділення показників поглинання червоного і синього кольору, та встановлюють кількісну характеристику хлорофілу а і b та каротиноїдів у мг/100 г вологої речовини за формулами:

$$X_{ла} = 10,82e^{3,5407 \left(\frac{A_r}{A_b} \right)^2}, \quad (1)$$

40

$$X_{лб} = 66,7e^{\frac{392,93 A_r}{A_b^2}}, \quad (2)$$

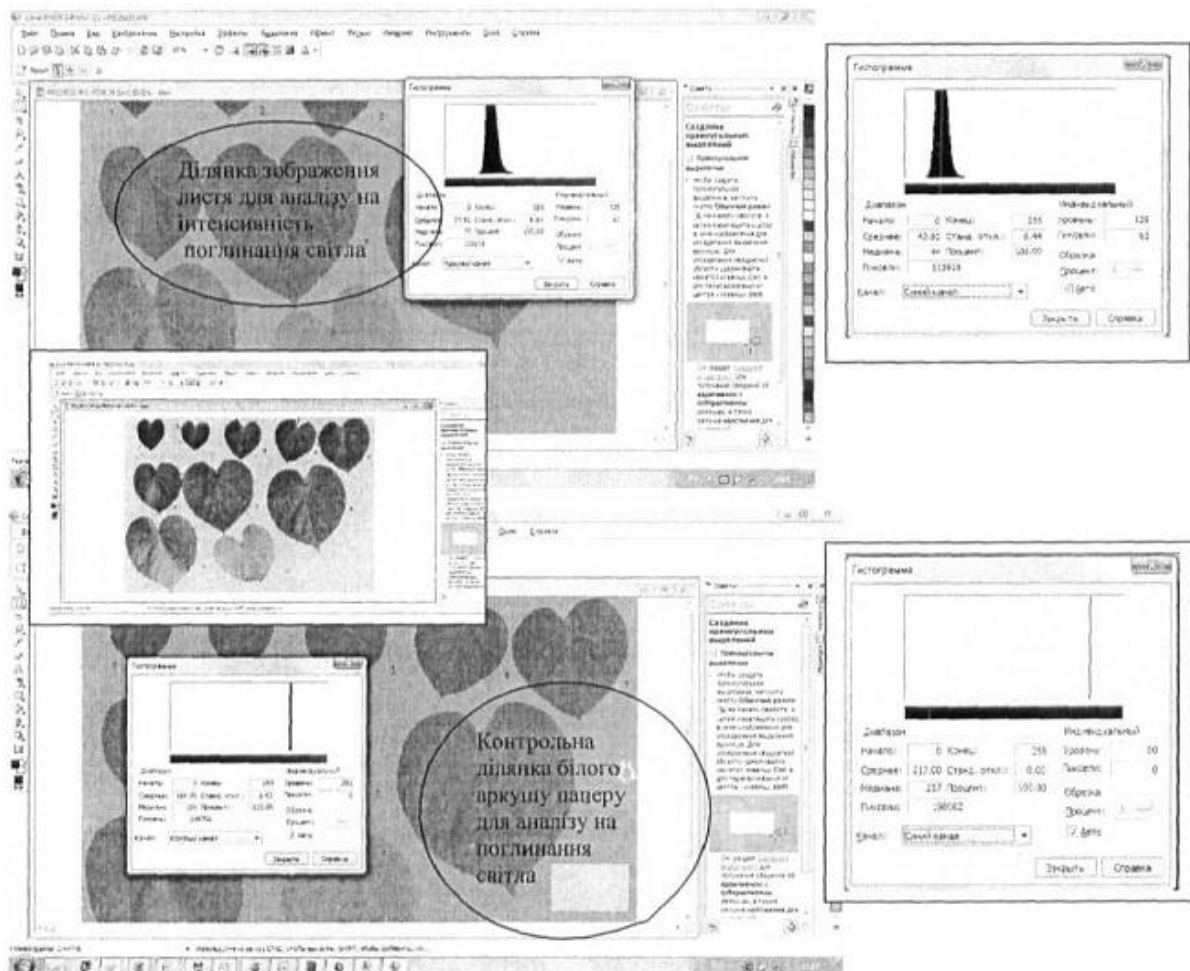
$$\text{Кар} = 446,52 \left(\frac{A_r}{A_b} \right)^3 - 588,88 \left(\frac{A_r}{A_b} \right)^2 + 231,17 \frac{A_r}{A_b} - 9,79, \quad (3)$$

де A_r , A_b - абсорбція у червоній та синій області спектра, відносні одиниці;

5 Хла - вміст хлорофілу а, мг/ 100 г;

Хлв - вміст хлорофілу б, мг/100 г;

Кар - вміст сумарних каротиноїдів, та за їх показниками судять про стан рослини, за яким прогнозують врожайність.



Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601